

TEFEZA CRISTINA SAMICO CAVALCANTI

ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA ASPARAGINA SÔBRE
A GLUTAMATO DESIDROGENASE DE DIFERENTES ÓRGÃOS
DE ANFÍBIOS E DE RATO.

Tese apresentada para a
obtenção do Título de
Mestre em Ciências, no
Instituto de Biologia
da UNICAMP.

- CAMPINAS -

1978

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

" No meio do caminho tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
tinha uma pedra
no meio do caminho tinha uma pedra.

Nunca me esquecerei desse acontecimento
na vida de minhas retinas tão fatigadas.
Nunca me esquecerei que no meio
do caminho tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
no meio do caminho tinha uma pedra."
(Andrade, C.D. ,1930)

À minha mãe, meu pai
e meus irmãos.

A meus filhos, Rafael
e Carolina, pela espe-
rança de dias melhores.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Quivo Schwartzburd Tahin pela orientação e principalmente pela amizade, durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Jr. por ter permitido que esse trabalho se realizasse no Departamento de Bioquímica.

Aos Profs. Drs. Hiroshi Aoyama, Julia Prado Franceschi, Maria Alice da Cruz Höfling e Nilce Correa Meirelles, pelas sugestões dadas a esse trabalho e pelo carinho que a mim dispensam.

Aos meus amigos, Edson Rosa Pimentel, Clara Tahin, Laudénir Maria Prioli, José Osmar Gaspar, Marcos Garcia Costa, Manoel Vianna, Romário de Araújo Mello, Shirlei Maria Recco, Telma Cristina Cavalcanti e Sonia Maria Lavratti Vianna, pelo carinho e amizade que me dispensaram durante essa fase difícil de minha vida.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica em especial a Maria das Graças Borba e Regina Célia Rossetto, pela ajuda dispensada durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro concedido, o qual possibilitou parte da realização desse trabalho.

ÍNDICE

	Página
I- INTRODUÇÃO.....	1
II- MATERIAIS E MÉTODOS	7
2.1. Materiais	7
2.2. Métodos	8
2.2.1. Dosagem de proteínas	8
2.2.2. Obtenção de Extrato Bruto (EB)	8
2.2.3. Determinação da atividade enzimáticaG1DH .	8
2.2.4. Determinação da atividade enzimáticaPG2DH.	10
2.2.5. Definições de Unidades.....	11
2.2.5.1. Unidades arbitrárias de atividade enzimática (U.A.)	11
2.2.5.2. Velocidade de reação	11
2.2.5.3. Atividade específica (A.E.).....	11
III-RESULTADOS	12
3.1. Efeito da Asn sôbre a atividade da G1DH de fígado, rim e coração de <u>R. catesbeiana</u>	12
3.2. Efeito do pH sôbre a atividade da G1DH de vários ór gãos de anfíbios e de rato, na ausência e na presença de Asn 50 mM	15
3.3. Efeito da variação da concentração de G1DH sôbre a velocidade da reaçãoenzimática na ausência e presença de Asn 50 mM	19
3.4. Dependência da atividade da G1DH de coração de <u>Bufo paracnemis</u> na ausência e presença de Asn 50 mM em função do tempo de reação	19

3.5. Efeito do ADP 0,1 mM sôbre a atividade da G1DH de coração de <u>B. paracnemis</u> , na ausência e presença de Asn 50 mM	26
3.6. Atividade da G2DH de diferentes órgãos de anfíbi- os na ausência e presença de Asn 50 mM	31
3.7. Efeito da Gln 50 mM, sôbre a atividade da G1DH de coração de <u>B. paracnemis</u> na ausência e presença de Asn 50 mM	34
IV- DISCUSSÃO	35
V- RESUMO	38
VI- ABSTRACT	40
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ABREVIATURAS

ADP= adenina difosfato

A.E. = atividade específica

Asn = asparagina

Gln = glutamina

G1DH= glutamato desidrogenase ativa quando usa NADH como coenzima.

G2DH= glutamato desidrogenase ativa quando usa NAD^+ como coenzima.

Glu= glutamato

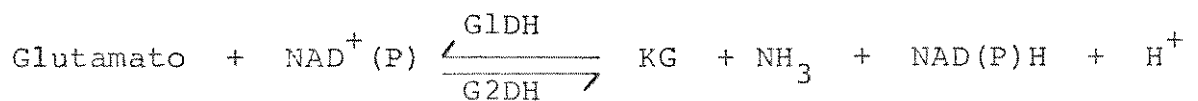
KG= alfa-cetoglutarato

NAD(P)= nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato)

Tris= tris-(hidroximetil) aminometano.

I. INTRODUÇÃO.

A L-glutamato desidrogenase, [L-glutamato NAD(P) oxi-redutase (desaminante) E.C.1.4.1.2-4] (EPSTEIN, I. and GROSSOWICZ, 1975) é uma enzima que catalisa a reação de desaminação oxidativa reversível do L-glutamato a alfa-cetoglu tarato e amônia na presença de NAD(P)^+ ou NAD(P)H , de acor do com a seguinte reação:



onde: G1DH = L-glutamato desidrogenase catalisando a forma ção do glutamato

G2DH = L-glutamato desidrogenase catalisando a desami nação do glutamato.

Possui um papel central na regulação do metabolismo da amô nia, do glutamato e do alfa-cetoglu tarato (SEYAMA et al., 1973), sendo importante na interrelação das vias metabólicas que envolvem reações de transaminações e o ciclo de Krebs (VERONESE et al., 1975 ; WALTON e COWEY, 1977).

É encontrada em diferentes organismos, tais como leveduras (BROWN et al., 1973), Trypanosoma cruzi (CAZ ZULO et al., 1977), Escherichia coli, Neurospora crassa, ervilha, milho, sementes, raízes, fígado, placenta, cérebro, rim, baço, músculo (FRIEDEN, 1963 ; SANWAL e LATA, 1962 ; MALENCIK e ANDERSON, 1972), Aspergillus nidulans (KINGHORN e PATEMAN, 1974), ovário (di MATTEO et al., 1976), útero (LAN et al., 1975). Sabe-se que em E. coli, a glutamato desidrogenase é estável ao calor e relativamente resistente a desnaturantes (VERONESE et al., 1975). Por outro lado, alguns pesquisadores conseguiram mutantes genéticos viáveis de microorganismos desprovidos de glutamato desidrogenase (ROBERTS, 1971 ; ARST e MACDONALD, 1973 ; GRENSON et al., 1974 e ARST et al., 1975).

Embora a glutamato desidrogenase de mitocôndrias seja a mais estudada e a que existe em maior quantidade dentro das células, já foram encontradas formas da enzima no núcleo celular (CAMARDELLA et al., 1970 ; BROWN et al., 1973 ; CASOLA et al., 1974).

KAWAJIRI et al (1977), demonstraram que o sítio de síntese da enzima, em células de fígado de rato, está localizado a nível de ribossomos e que, após ser sintetizada a enzima é transportada do retículo endoplasmático rugoso para o retículo endoplasmático liso e finalmente para as mitocôndrias.

A glutamato desidrogenase de fígado de boi, foi cristalizada pela primeira vez por OLSON e ANFINSEN (1952). A molécula da enzima de fígado de boi é um tetrâmero de peso

molecular de 1 milhão, que por diluição se dissocia em subunidades com peso molecular igual a 25 mil (EISENBERG et al., 1976), com seis grupos -SH por subunidade, grupos esses de grande importância para a atividade da enzima (KAPOOR e PERFETT, 1977) e 500 resíduos de aminoácidos, onde se destacam as lisina-27,126,419 e 422 e a tirosina-406, que são fundamentais para o sítio ativo, sítio regulatório e processos de associação (RASCHED et al., 1974).

A enzima de fígado de boi é composta de diferentes configurações moleculares em equilíbrio e sua atividade catalítica depende dos substratos utilizados, sendo maior a atividade quando usamos o glutamato como substrato, quando comparado com a alanina (TALAL e TOMKINS, 1964b).

A atividade catalítica da glutamato desidrogenase de fígado de boi, pode ser afetada por uma série de substâncias. Algumas dessas são inibitórias como o estradiol, dietilstilbestrol, progesterona (YIELDING et al., 1960), ácido glutárico, GTP (PANTALONI e LÉCUYER, 1973 ; KOBERSTEIN e SUND, 1973), altas concentrações de L-glutamato (SHAFER, 1972 ; KOBERSTEIN e SUND, 1973), ácido fólico (WHITE et al., 1976), altas concentrações de NADH (KRAUSE et al., 1974) e reagentes possuidores do grupamento tiol (KLYUEVA e TITOVA, 1976). Outras como por exemplo, altas concentrações de NAD^+ (ANDREE e ZANTEMA, 1978), NADP^+ (EISENBERG et al., 1973) e o ADP (COHEN e BENEDEK, 1976) aumentam a atividade enzimática.

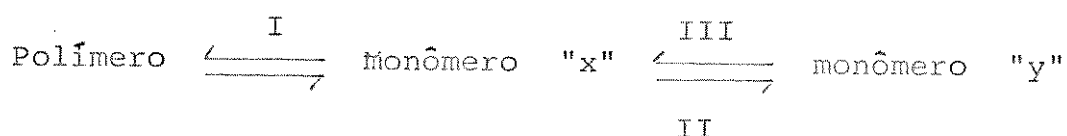
Quando moléculas efetoras ligam-se a glutamato desidrogenase, ocorrem duas mudanças conformacionais, uma induzida pela coenzima e outra por nucleotídeos da guanina. Quando a coenzima utilizada é o NADH ocorre uma mudança conformacional adicional, como consequência o NADH liga-se a outro sítio, provavelmente não ativo (HUANG e FRIEDEN, 1972 ; FISHER, 1973).

A maioria das glutamatos desidrogenases de vertebrados não mostram especificidade para coenzimas, enquanto que, as de microorganismos como N. crassa e E. coli e de espécies não animais já foram isoladas dois tipos de enzimas, uma NAD-dependente e outra NADP-dependente (VERONESE et al., 1975 ; EISENBERG et al., 1976). Já em peixes a enzima é regulada por nucleotídeos purínicos de um modo semelhante a dos vertebrados, mas exige uma especificidade para coenzimas, em presença do NAD^+ , a glutamato desidrogenase de atum é 15 vezes mais ativa do que quando se utiliza NADP^+ (VERONESE et al., 1976), fato também observado em fígado de truta (WALTON e COWEY, 1977).

A atividade da glutamato desidrogenase está relacionada com o seu menor ou maior estado de agregação e esse estado é dependente da concentração enzimática, da concentração de moléculas efetoras (BITENSKY et al., 1965 ; FRIEDEN e COLMAN, 1967; EISENBERG et al., 1976 ; THUSIUS, 1977), podendo inibir ou ativar a catálise enzimática (THUSIUS et al., 1975 ; JULLIEN e THUSIUS, 1976).

A glutamato desidrogenase de fígado de boi, apresenta dois níveis de organização: a) unidades ativas, na presença do glutamato, com arranjos hexaméricos de seis cadeias idênticas que se associam de maneira linear e com um peso molecular ainda não definido e que se dissociam por simples diluição; b) unidades inativas, na presença do glutamato, que também tem a forma de hexâmeros (JALLON et al., 1970 ; HUANG e FRIEDEN, 1972 ; THUSIUS, 1975).

A polimerização da enzima poderia se realizar segundo um modelo que presuppõe a existência de dois tipos de monômeros, segundo o esquema abaixo:



onde : I = associação dependente da concentração enzimática
 II = formação do monômero "y", favorecido pela adição de NADH, GTP e ATP.

III = formação do monômero " x", favorecido pela adição de ADP e leucina (TOMKINS et al., 1965 ; EISENBERG et al ., 1976 ; THUSIUS, 1977).

JANSSENS (1972) encontrou um comportamento eletroforético da glutamato desidrogenase de Xenopus laevis diferente quando comparava a enzima proveniente do rim e do fígado, sugerindo que a maior mobilidade da primeira estaria relacionada com um menor grau de polimerização e que esse fato poderia estar relacionado com a atividade enzimática. A glutamato desidrogenase hepática de Pipa carvalhoi ,

um outro anfíbio aquático como o X. laevis, é mais ativa quando utiliza NADH do que quando utiliza NAD^+ (MAGNA et al., 1975 ; MAGNA et al., 1976), e ainda parece que desempenha um papel mais significativo na incorporação da amônia pelo alfa-cetoglutarato em comparação com enzimas obtidas de fígados de anfíbios de hábitos predominantemente terrestre (TAHIN et al., 1978).

MEIRELLES e TAHIN (1975), mostraram que a asparagina na concentração de 50 mM, causa um aumento marcante na atividade da glutamato desidrogenase de fígado de anfíbios anuros, principalmente quando a coenzima utilizada era o NADH e que aquele aminoácido parecia favorecer a polimerização da enzima e anular o efeito dissociador do ATP.

BEZERRA e TAHIN (1977), demonstraram que o efeito da asparagina é diretamente proporcional a baixas concentrações enzimáticas, sugerindo que a asparagina não atuaria se a enzima estivesse previamente em seu estado de agregação, favorecido por altas concentrações protéicas.

Nesta Tese procuramos demonstrar se o efeito da asparagina encontrado em fígado de Bufo paracnemis, poderia ser generalizado para outros órgãos de anfíbios ou de rato, bem como analisar possíveis alterações que a asparagina causaria sobre a atividade enzimática da glutamato desidrogenase. Dessa forma determinamos a concentração ótima de asparagina que atuaria sobre a enzima, seu efeito em diferentes pHs, em diferentes concentrações enzimáticas e a correlação desse efeito com aquele causado pelo ADP.

II. MATERIAIS E MÉTODOS.

2.1. MATERIAIS -

Tris (hidroximetil) aminometano (SIGMA)
Albumina de soro bovina (SIGMA)
Brometo de cetiltrimetilamônia (SIGMA)
Ácido alfa-glutárico (SIGMA)
ADP, NAD^+ , NADH (SIGMA)

Todos os demais reagentes, eram de grau analítico. As centrifugações foram realizadas em centrífuga refrigerada Sorvall RC-2B com rotor de raio 4,25; as determinações da atividade enzimática foram realizadas em um colorímetro Turner, modelo 339 a uma $A_{340 \text{ nm}}$; as dosagens protéicas foram efetuadas em um espectrofotômetro Zeiss PMQII, modelo 86696 a uma $A_{700 \text{ nm}}$ e as homogeneizações em um homogeneizador Sorvall (OMNI-MIXER), modelo 7656.

Os anfíbios utilizados neste trabalho foram das seguintes procedências: Bufo paracnemis, coletados no município de Itapira (São Paulo) e Rana catesbeiana (girinos e adultos), criada no município de Jundiaí (São Paulo); os ratos machos foram obtidos no biotério do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Dosagem de proteínas

As dosagens protéicas, foram realizadas segundo o método descrito por LOWRY (1951). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a $A_{700 \text{ nm}}$ e em cubetas de 5 x 1 cm.

2.2.2. Obtenção do Extrato Bruto (EB)

Após sacrifício dos animais, os órgãos eram retirados e picados em solução de cloreto de sódio 0,155 M gelada e exaustivamente lavados até que a solução de lavagem se apresentasse límpida. Para cada grama de órgão era adicionada 3ml de uma solução de CTAB 0,1%. A seguir era homogeneizado em OMNI-MIXER em rotação máxima por 1 minuto em baixa temperatura. O extrato assim obtido era centrifugado a $12100 \times g/10'/0^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante obtido dessa centrifugação era denominado de EB, que era usado imediatamente ou estocado em "freezer".

2.2.3. Determinação da atividade enzimática GLDH

Neste trabalho chamamos de GLDH, a glutamato desidrogenase ativa na presença de NADH e alfa-cetogluta-

rato para a formação do L-glutamato.

Para a determinação dessa atividade enzimática foram usadas as seguintes soluções: Solução I contendo: NH_4Cl 10 mM; KG 4 mM; NADH 0,1 mM e Tris 100 mM em pH 8,0 ajustado com HCl e a Solução I-Asn contendo: todos os reagentes acima descrito adicionado de Asn 50 mM, o pH era de 8,5 ajustado com HCl. Quando se fazia necessário adicionávamos ADP 0,1 mM e Gln 50 mM. As reações enzimáticas eram sempre realizadas a 30°C.

O método de determinação da atividade enzimática GldH, está baseado no consumo de NADH determinado pelo decréscimo da absorbância a 340 nm ($A_{340 \text{ nm}}$) por minuto de reação. A reação era iniciada pela adição de um volume apropriado do BB a 3ml de Solução-I ou Solução I-Asn e as leituras eram realizadas em adequados intervalos de tempo, conforme cada experimento, durante um tempo total que variava de 1 a 5 minutos. Quando a GldH estava muito ativa as leituras da absorbância foram efetuadas de 5 em 5 segundos. Na maioria das vezes, no entanto, eram feitas de 15 em 15 segundos, e quando a enzima estava pouco ativa era realizada de minuto em minuto. Em todos os casos calculava-se a velocidade inicial da reação enzimática pela determinação gráfica da tangente à curva da dependência do consumo de NADH em função do tempo.

2.2.4. Determinação da atividade enzimática G2DH

Neste trabalho chamamos de G2DH, a glutamato desidrogenase ativa na presença de NAD^+ e L-glutamato para a formação do alfa-cetoglutarato.

Para a determinação dessa atividade enzimática foram usadas as seguintes soluções: Solução II contendo: Glu 10 mM; ADP 0,1 mM; NAD^+ 0,1 mM e Tris 100 mM pH 8,5 ajustado com HCL e a Solução II-Asn contendo: todos os reagentes acima descritos, adicionado de Asn 50 mM, o pH era de 8,5 ajustado com HCL. As reações enzimáticas eram sempre realizadas a 30°C.

O método de determinação da atividade enzimática da G2DH está baseado na formação de NADH, determinado pelo aumento da absorvância a 340 nm por minuto de reação. A reação enzimática era iniciada pela adição de um volume apropriado do EB a 3ml da Solução II ou da Solução II-Asn e as leituras eram realizadas em um intervalo de tempo de 15 em 15 segundos num tempo total de 5 minutos. Em todos os casos calculava-se a velocidade inicial da reação enzimática pela determinação gráfica da tangente à curva da dependência da formação de NADH em função do tempo.

2.2.5. Definições de unidades

2.2.5.1. Unidades arbitrárias da atividade enzimática (U.A.)

Define-se nesse trabalho como 1 U.A. ao milésimo de $A_{340 \text{ nm}}$ que diminui ou aumenta em um dado tempo de reação nas condições experimentais.

2.2.5.2. Velocidade da reação

É aqui expressa pelo número de U.A./minutos.

2.2.5.3. Atividade específica (A.E.)

Uma unidade de A.E. é aqui expressa como o número de U.A./minuto/mg de proteínas da solução estudada.

III. RESULTADOS.

3.1. Efeito da Asn sôbre a atividade da G1DH de fígado, rim e cõração de R. catesbeiana :

MEIRELLES e TAHIN (1975) e BEZERRA e TAHIN (1977) demonstraram que a Asn 50 mM tem a capacidade de aumentar significativamente a velocidade enzimática da G1DH de fígado de anfíbios.

Estudando o efeito de diferentes concentrações (1,25 a 200 mM) de Asn sôbre a atividade da G1DH de fígado rim e coração de R. catesbeiana, verificamos que a Asn desde 1.25 mM causam aumentos significantes da atividade enzimática; aumentos progressivos da concentração de Asn provocam aumentos não lineares da atividade enzimática da G1DH, até a concentração de 50 mM, sendo que concentrações superiores a essa apresentam praticamente o mesmo efeito (Figura 1). Resultados semelhantes foram encontrados para G1DH de diferentes origens (resultados não mostrados nesse trabalho). Nesse sentido apresentamos na Tabela 1 os valores encontrados de A.E. de G1DH de fígado, rim e coração de diferentes animais, na ausência e presença de Asn 50 mM, onde notamos que a G1DH proveniente do coração das três espécies estudadas, mostrou ser mais sensível ao efeito da Asn do que os outros órgãos. A G1DH hepática de B. paracnemis é mais sensível que a renal, enquanto que o inverso foi observado para a G1DH de girino de R. catesbeiana e também de rato (Tabela 1).

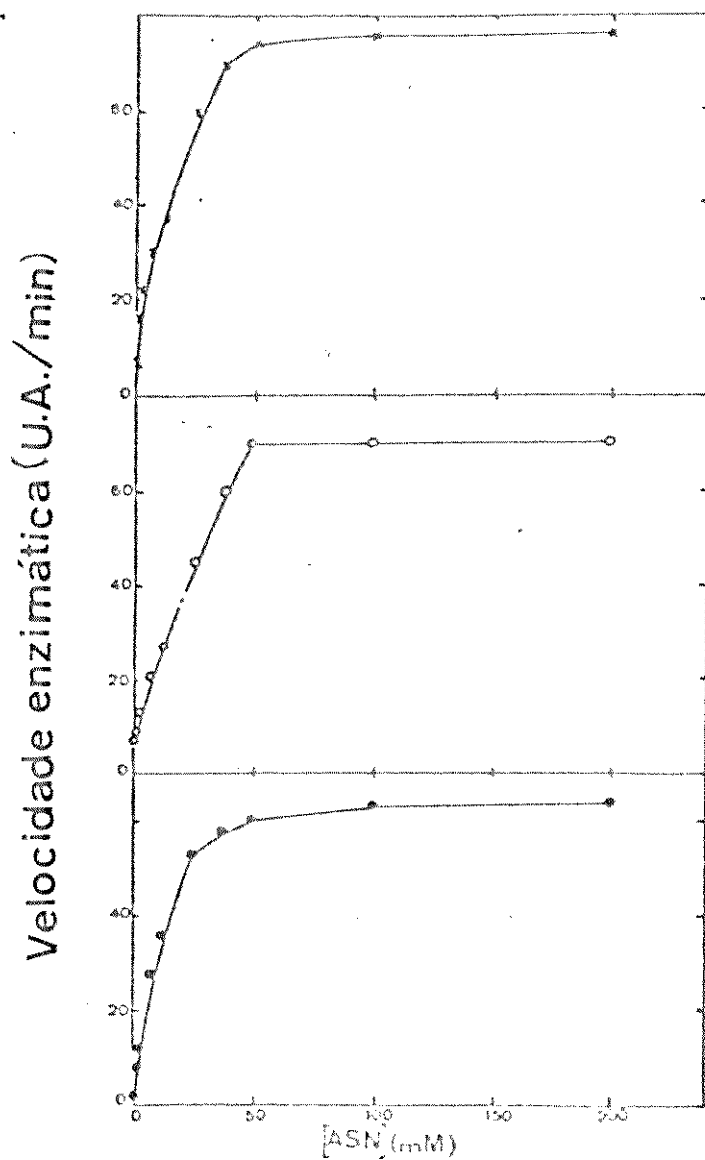


FIGURA 1 - Efeito da concentração da Asn sobre a G1DH de fígado (x—x), rim (o—o) e coração (●—●) de *Rana catesbeiana*. Nos ensaios com G1DH de fígado foram utilizados em, cada experimento, 8 μ l do EB, contendo 0,07 mg de proteínas totais; nos ensaios com G1DH de rim foram utilizados em, cada experimento, 160 μ l do EB, contendo 0,25 mg de proteínas totais e nos ensaios com G1DH de coração foram utilizados em, cada experimento, 10 μ l do EB, contendo 0,02 mg de proteínas totais. Detalhes sobre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

TABELA 1 - Efeito da Asn 50 mM sôbre a atividade específica da GlDH de várias origens (1)

Origem da GlDH	Atividade específica (U.A./min/mg)		
	sem Asn	com Asn	R ⁽⁴⁾
Fígado B _p ⁽²⁾	45,0	952,5	21,2
Rim de B _p	25,8	262,4	10,5
Coração de B _p	52,0	3848,5	74,0
Fígado de gR _c ⁽³⁾	18,1	193,0	10,7
Rim de gR _c	20,1	364,2	18,1
Coração de gR _c	5,9	488,7	82,6
Fígado de rato	156,0	1580,0	10,1
Rim de rato	43,1	2150,5	49,9
Coração de rato	58,3	5524,8	94,7

(1) Os dados mostrados nesta Tabela são resultados obtidos a partir dos valores de pH ótimos expostos nas Figuras 2, 3 e 4.

(2) B_p = Bufo paracnemis.

(3) gR_c = girino (pré-metamorfose, estágio XI) Rana catenbeiana.

(4) = relação entre a atividade específica da GlDH com e sem Asn.
Definição sôbre a A.E. e outros detalhes sôbre as condições experimentais estão em Materiais e Métodos.

3.2. Efeito do pH sôbre a atividade da G1DH de vários órgãos de anfíbios e de rato, na ausência e presença de Asn 50 mM :

A G1DH de fígado, rim e coração de B. paracnemis apresenta um pH ótimo em torno de 8,0 - 8,2 na ausência de Asn e de 8,5 - 8,7 na presença de Asn 50 mM (Figura 2). A G1DH de rim e coração de girinos de R. catesbeiana, apresenta um pH ótimo de 8,0 - 8,2 na ausência de Asn e de 8,5 - 8,7 na presença de Asn 50 mM, porém as GDH de fígado desses mesmos animais apresentam um pH ótimo de 8,5 - 8,7 na ausência de Asn e de 8,9 - 9,1 na presença de Asn 50 mM (Figura 3). A G1DH de rim, fígado e coração de rato apresenta pH ótimo, respectivamente, de 8,4 - 8,6 ; 7,4 - 7,6 e 7,9 a 8,1, na ausência de Asn, enquanto na presença de Asn o pH ótimo da enzima variava entre 8,5 - 9,0 (Figura 4). Para todas as G1DH das diferentes origens estudadas foi observado que a Asn causa um deslocamento do pH ótimo para o lado mais alcalino e que seu efeito pode ser observado em todos os pH estudados.

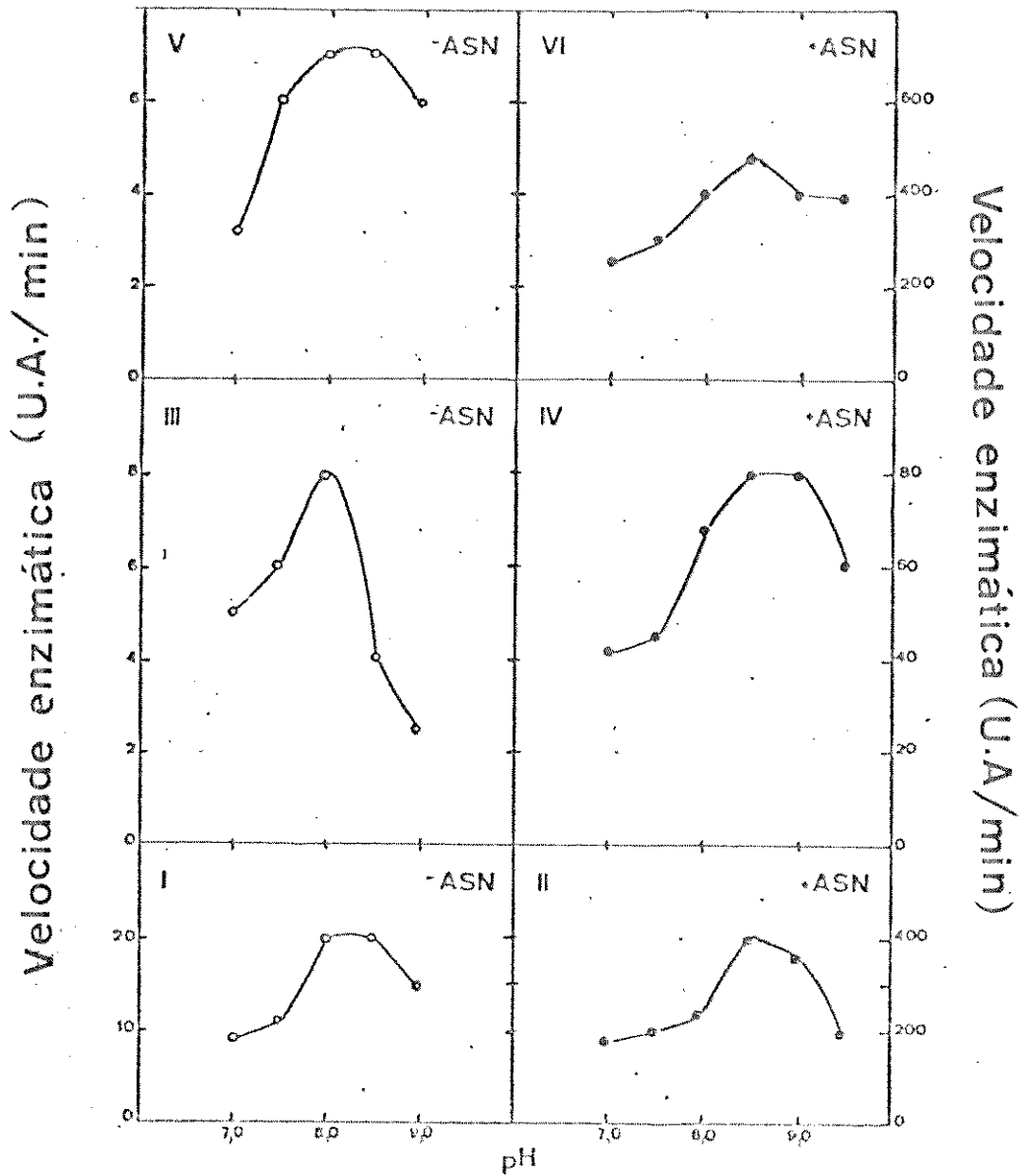


FIGURA 2 - Efeito do pH sôbre a atividade da GlDH de fígado (I e II), rim (III e IV) e coração (V e VI) de Bufo paracnemis, na ausência e presença de Asn 50 mM. Nos ensaios I e II foram utilizados, em cada experimento, 20 μ l do EB, contendo 0,47 mg de proteínas totais, nos ensaios III e IV foram utilizados em cada experimento, 50 μ l do EB, contendo 0,31 mg de proteínas totais e nos ensaios V e VI foram utilizados em cada experimento, 20 μ l do EB, contendo 0,12 mg de proteínas totais. Detalhes sôbre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

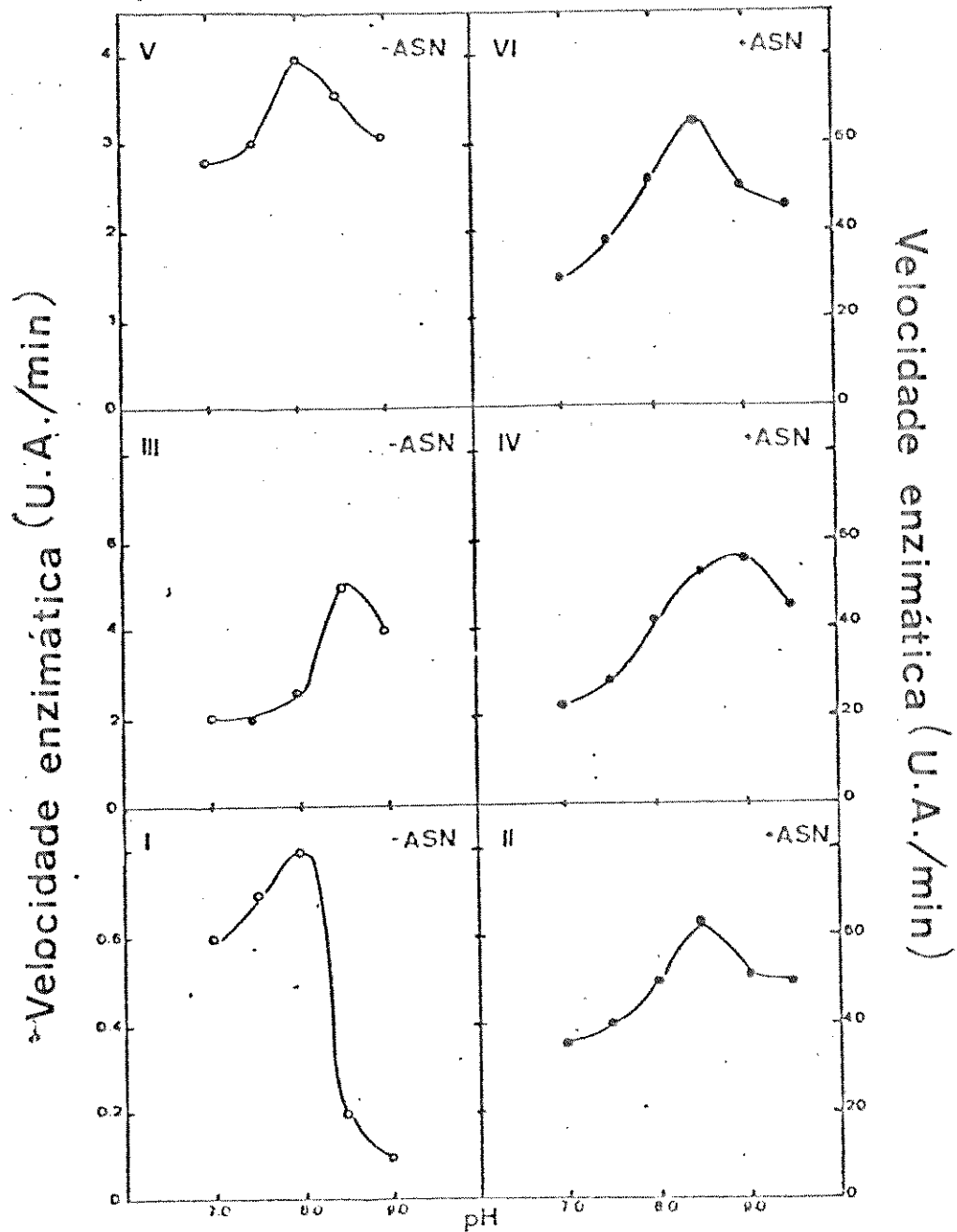


FIGURA 3 - Efeito do pH sôbre a atividade da GlDH de co-ração (I e II), fígado (III e IV) e rim (V e VI) de girinos (estágio XI, pre-metamorfose) de *Rana catesbeiana*, na ausência e presença de Asn 50 mM. Nos ensaios I e II foram utilizados, em cada experimento, 100 μ l do EB, contendo 0,13 mg de proteínas totais; nos ensaios II e IV foram utilizados, em cada experimento, 20 μ l do EB, contendo 0,31 mg de proteínas totais e nos ensaios V e VI foram utilizados, em cada experimento 100 μ l do EB, contendo 0,18 mg de proteínas totais. Detalhes sôbre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

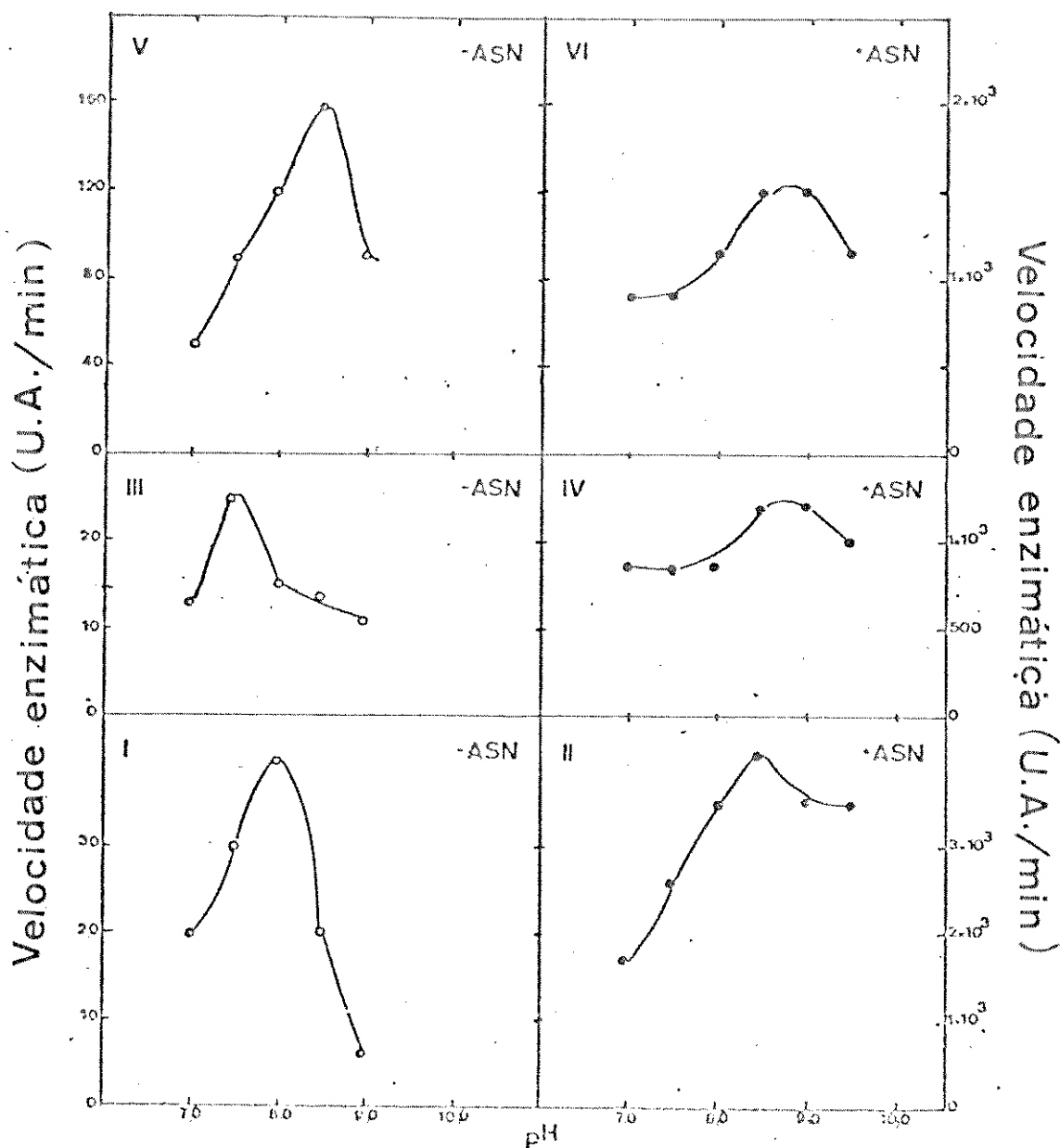


FIGURA 4 Efeito do pH sôbre a atividade da GDH de coraçãõ (I e II), fígado (III e IV) e rim (V e VI) de rato, na ausência e presença de Asn 50 mM. Nos ensaios I e II foram utilizados, em cada experimento, 100 μ l do EB, contendo 0,72 mg de proteínas totais; nos III e IV foram utilizados, em cada experimento, 100 μ l do EB, contendo 0,55 mg de proteínas totais e nos ensaios V e VI foram utilizados, em cada experimento, 100 μ l do EB, contendo 1,01 mg de proteínas totais. Detalhes sôbre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

3.3. Efeito da variação da concentração de G1DH sôbre a velocidade da reação enzimática na ausência e presença de Asn 50 mM :

As G1DH de fígado, rim e coração de anfíbios bem como as de rato apresentam na ausência da Asn uma dependência não linear da velocidade da reação enzimática em função da variação da concentração da enzima, por outro lado, na presença de Asn 50 mM tal dependência passa a ser linear. Pudemos demonstrar esse fato para rim, fígado e coração de B. paracnemis (Figura 5); para rim, fígado e coração de R. catesbeiana (Figura 6); para rim (Figura 7) , coração (Figura 8) e fígado (Figura 9) de rato. Esses resultados também confirmam observações anteriores de que a G1DH de coração dos animais estudados foi sempre mais sensível ao efeito da Asn do que as de outros órgãos do mesmo animal.

3.4. Dependência da atividade da G1DH de coração de Bufo paracnemis na ausência e presença de Asn 50 mM em função do tempo de reação :

Demonstramos para a G1DH de coração de B. paracnemis, na ausência de asparagina, que a atividade enzimática variou não linearmente em função do tempo de reação, observado para diferentes concentrações da enzima (Figura 10). No entanto, a enzima na presença de Asn 50 mM, varia linearmente em função do tempo de reação, observado particularmente quando usamos baixas concentrações da enzima (Figura 11).

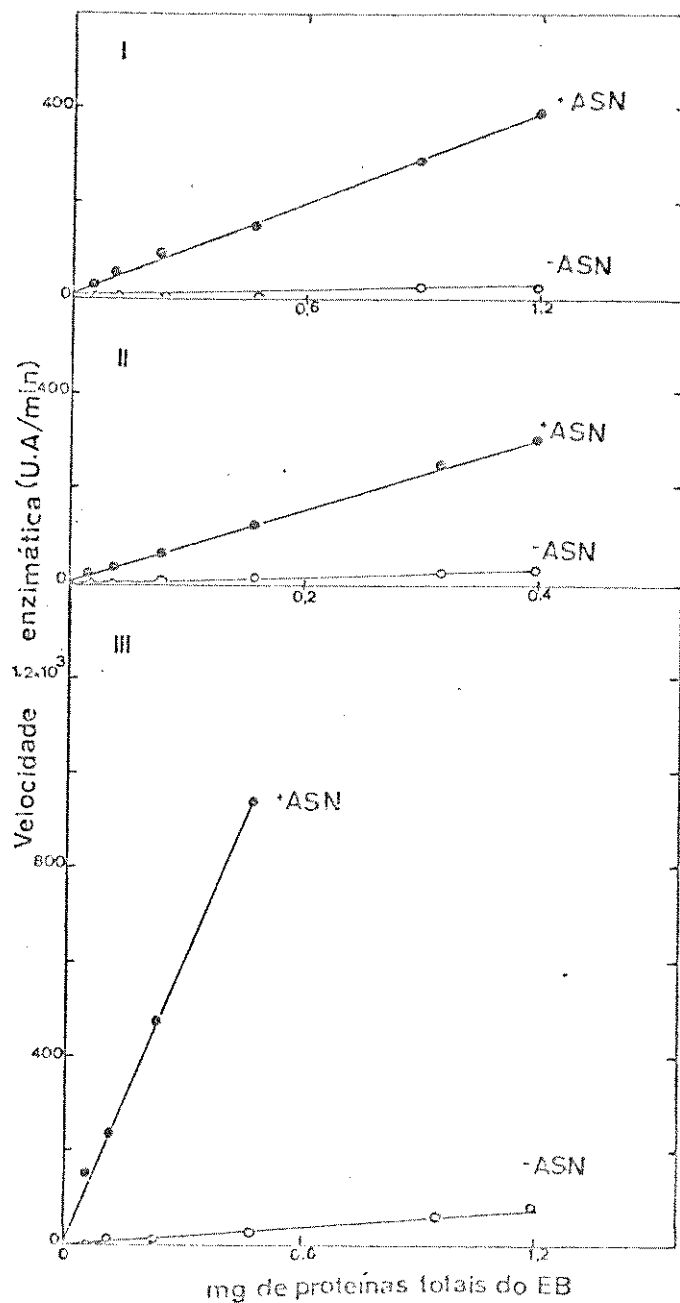


FIGURA 5 - Efeito da concentração de GLDH de rim (I), fígado (II) e coração (III) de Bufo paracnemis, sobre a velocidade da reação enzimática na ausência e presença de Asn 50 mM. Detalhes sobre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

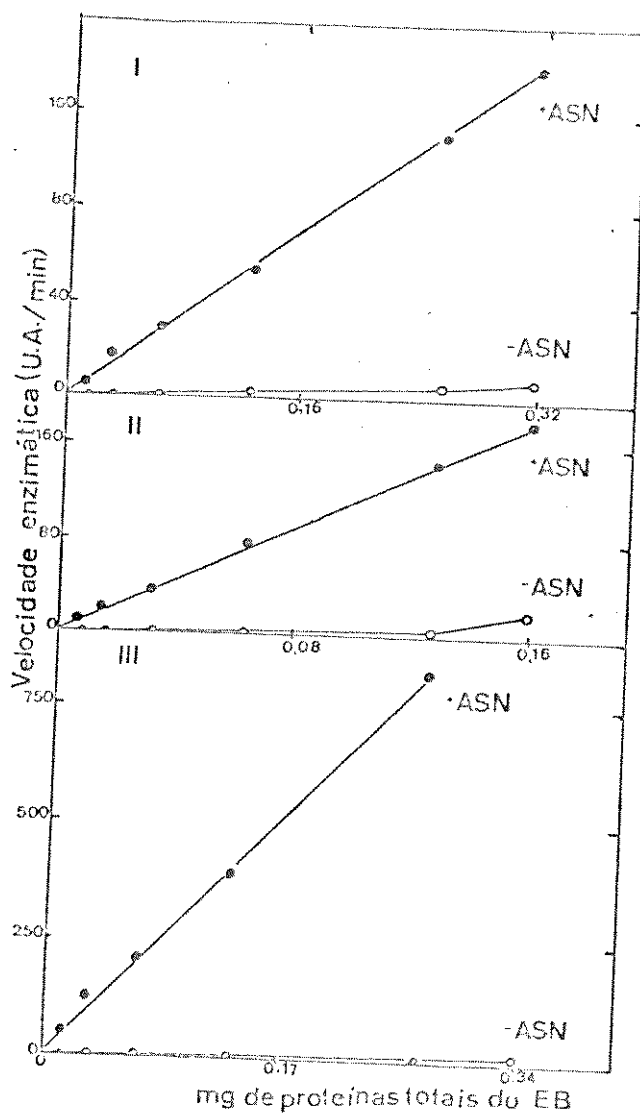


FIGURA 6 - Efeito da concentração de GLDH de rim (I), fígado (II) e coração (III) de Rana catesbeiana, sobre a velocidade da reação enzimática na ausência e na presença de Asn 50 mM. Detalhes sobre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

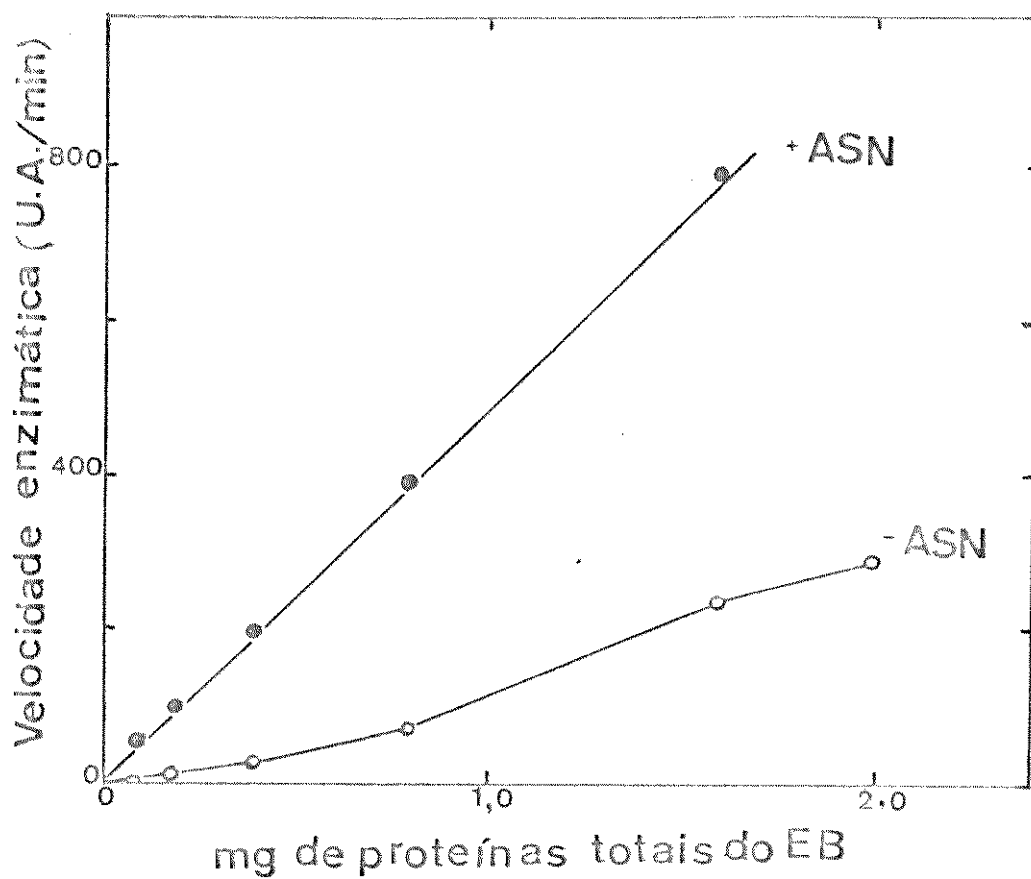


FIGURA 7 - Efeito da concentração de GLDH de rim de rato sobre a velocidade da reação enzimática na ausência e presença de Asn 50 mM. Detalhes sobre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

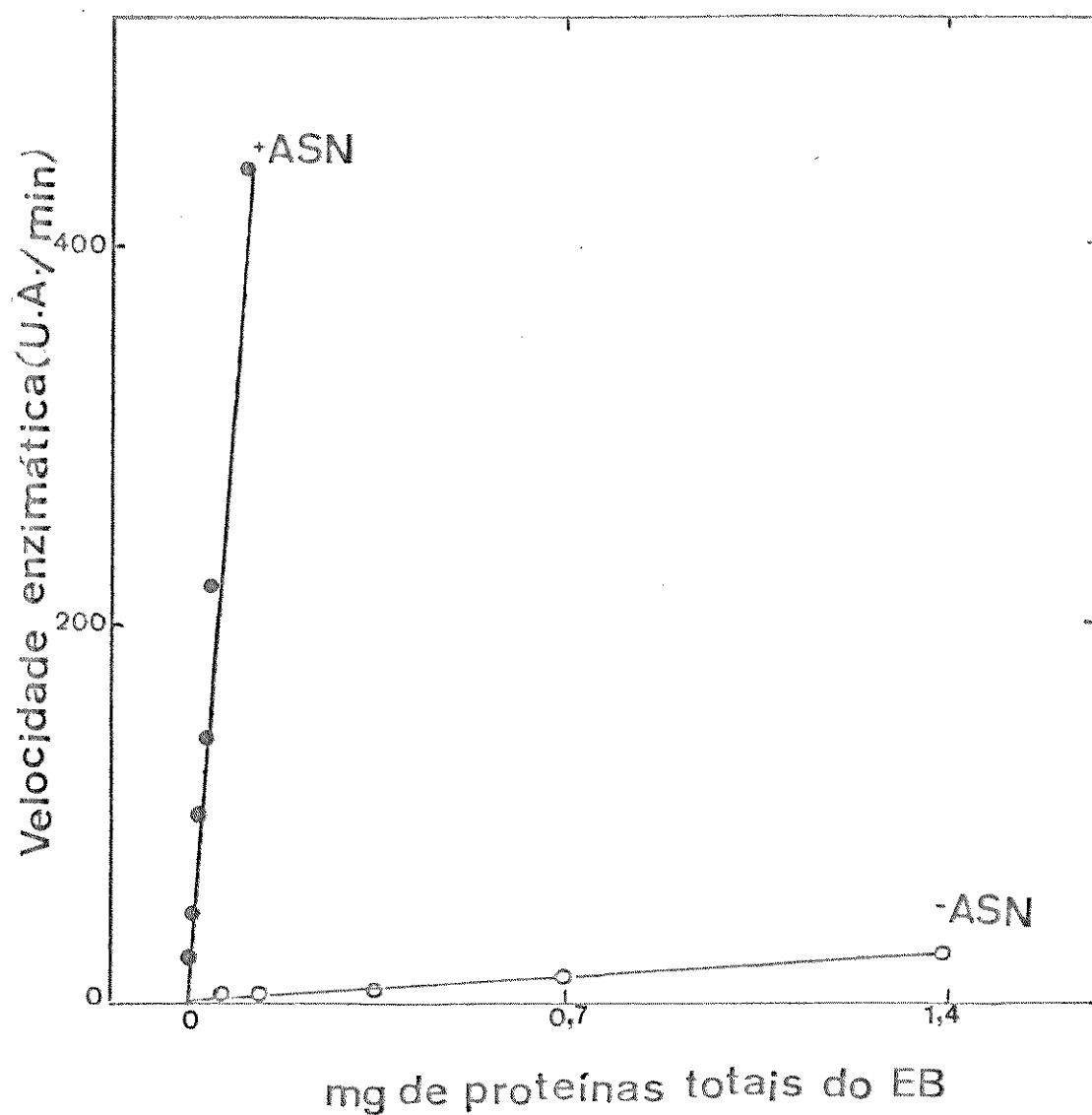


FIGURA 8 - Efeito da concentração de GlDH de coração de rato sobre a velocidade da reação enzimática na ausência e presença de Asn 50 mM . Detalhes sobre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

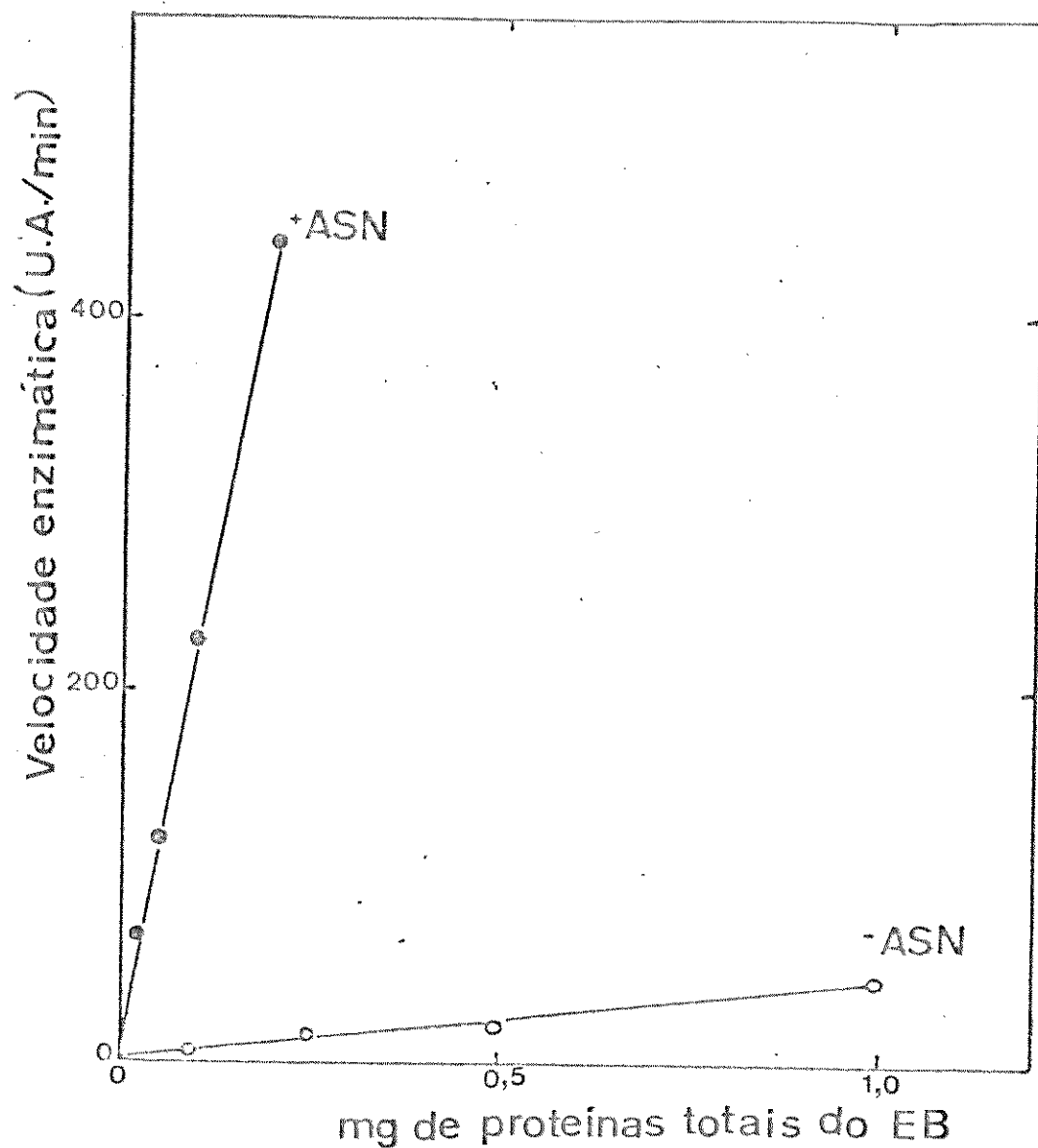


FIGURA 9 - Efeito da concentração de G1DH de fígado de rato sôbre a velocidade da reação enzimática na ausência e presença de Asn 50 mM. Detalhes sôbre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

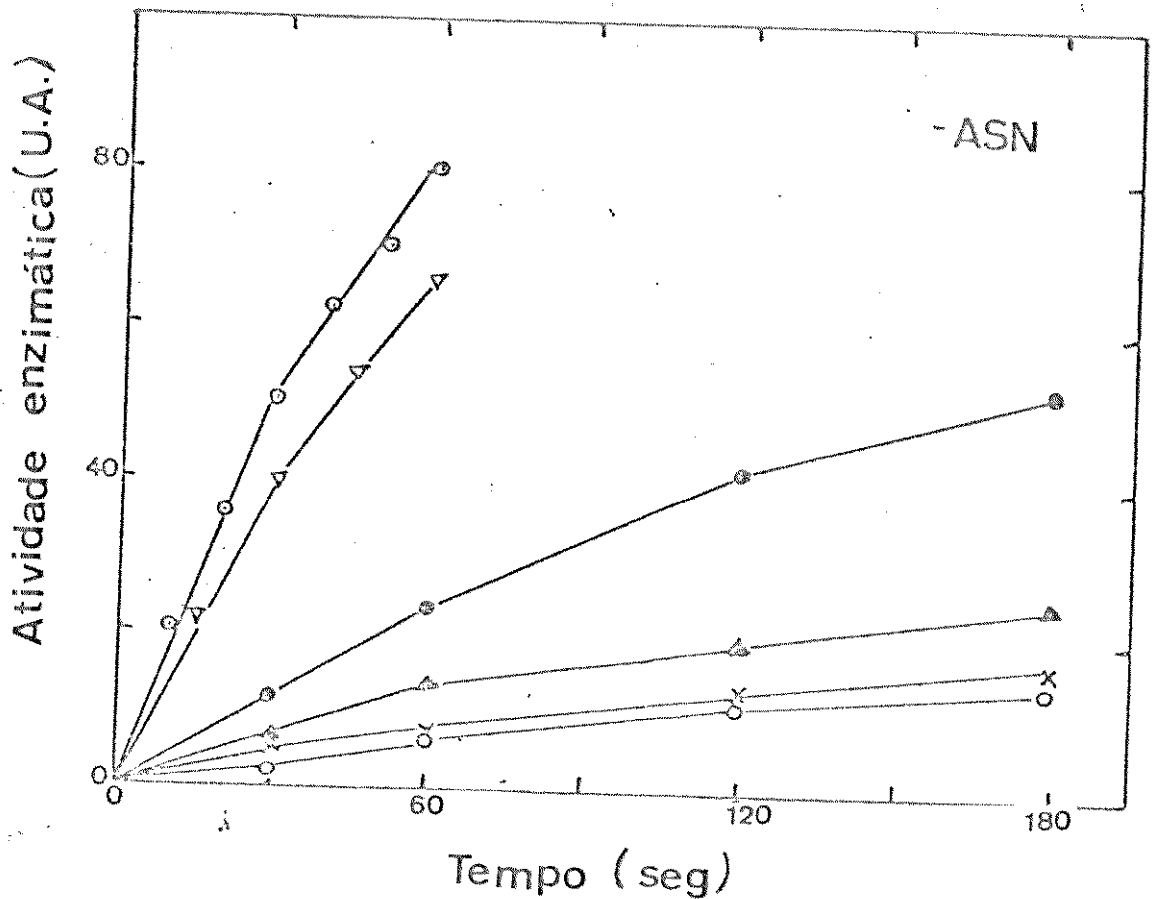


FIGURA 10 - Variação da atividade da reação enzimática em função do tempo de reação, da concentração de G1DH de coração de Bufo paracnemis, na ausência de Asn. (○—○) com 64 µg de proteínas totais do EB; (x—x) com 128 µg de proteínas totais do EB; (△—△) com 256 µg de proteínas totais do EB; (●—●) com 512 µg de proteínas totais do EB; (▲—▲) com 1024 µg de proteínas totais do EB e (⊙—⊙) com 2048 µg de proteínas totais do EB. Detalhes sôbre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

3.5. Efeito do ADP 0,1 mM sôbre a atividade da G1DH de co-
ração de *B. paracnemis* , na ausência e presença de Asn
50 mM :

Pelo fato de ser o ADP um importante efetor alostérico da GDH e possivelmente também importante na regulação fisiológica da enzima, estudamos o efeito desse nucleotídeo sôbre a velocidade da reação enzimática na ausência e presença da Asn 50 mM. Na figura 12 mostramos que, mesmo na presença de ADP 0,1 mM, mas na ausência de Asn, a dependência da atividade da G1DH de coração de *B. paracnemis*, continua sendo uma função linear do tempo de reação, observado em diferentes concentrações da enzima. No entanto, em idênticas condições, mas na presença de Asn, tal função mostra-se linear (Figura 13). Baseando-se nos resultados expostos nas Figuras 12 e 13, determinamos as velocidades das reações enzimáticas para cada concentração da enzima estudada (Tabela 2). As velocidades das reações enzimáticas na ausência ou presença de ADP 0,1 mM e na ausência e presença de Asn 50mM em função de diferentes concentrações de G1DH de *B. paracnemis*, também mostram ser uma função linear.

Nas concentrações de G1DH de coração de *B. paracnemis* estudadas, pode-se observar que o ADP não favoreceu a atividade enzimática na ausência de Asn, no entanto, na presença de Asn 50 mM, parece aumentar mais ainda o efeito que a Asn tem sôbre a G1DH (Figura 14).

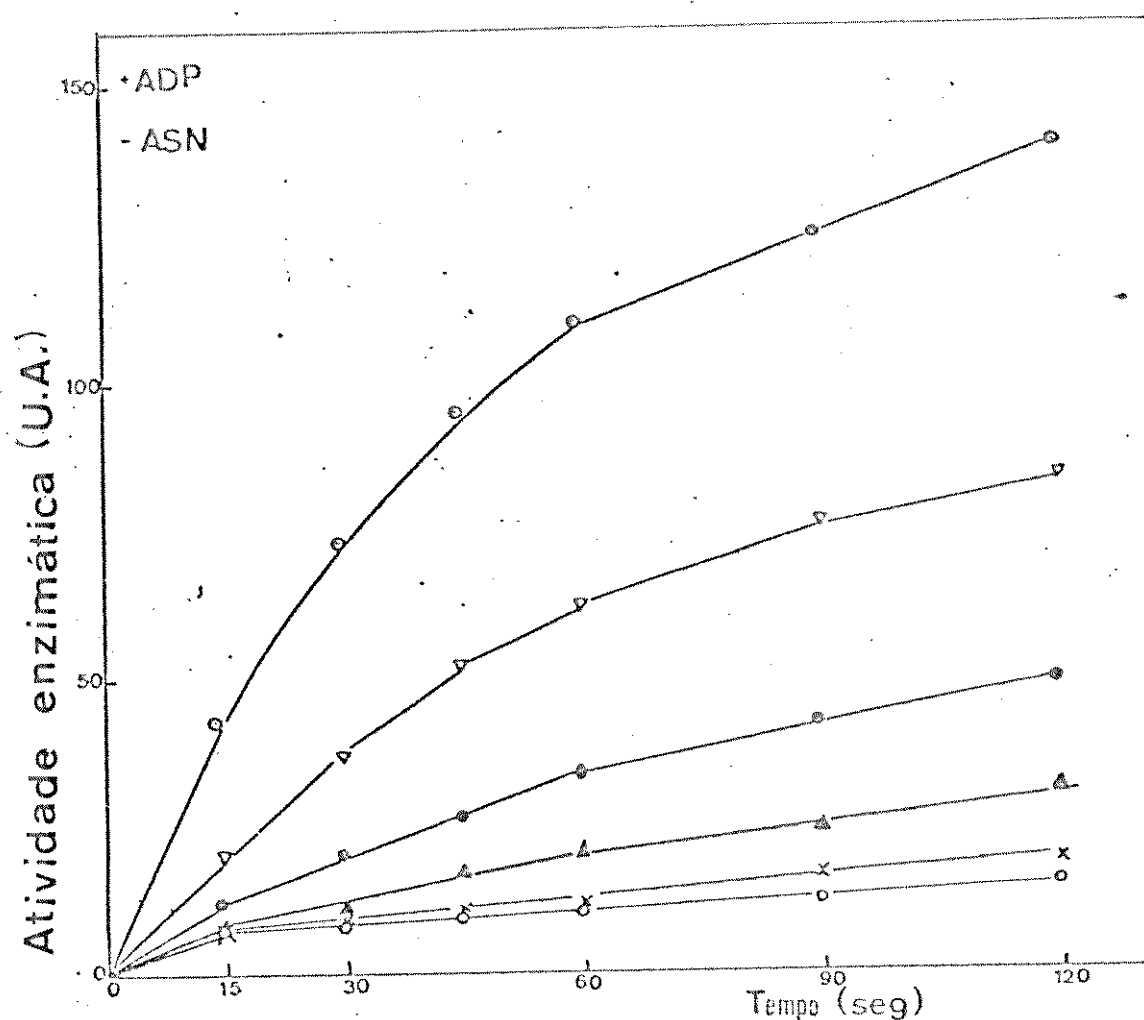


FIGURA 12 - Variação da atividade da reação enzimática em função do tempo de reação, da concentração de GlDH de coração de Bufo paracnemis, na presença de ADP 0,1 mM e na ausência de Asn. (o—o) com 64 µg de proteínas totais do EB; (x—x) com 128 µg de proteínas totais do EB; (▲ —▲) com 256 µg de proteínas totais do EB; (●—●) com 512 µg de proteínas totais do EB; (△ —△) com 1024 µg de proteínas totais do EB e (○—○) com 2048 µg de proteínas totais do EB. Detalhes sobre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

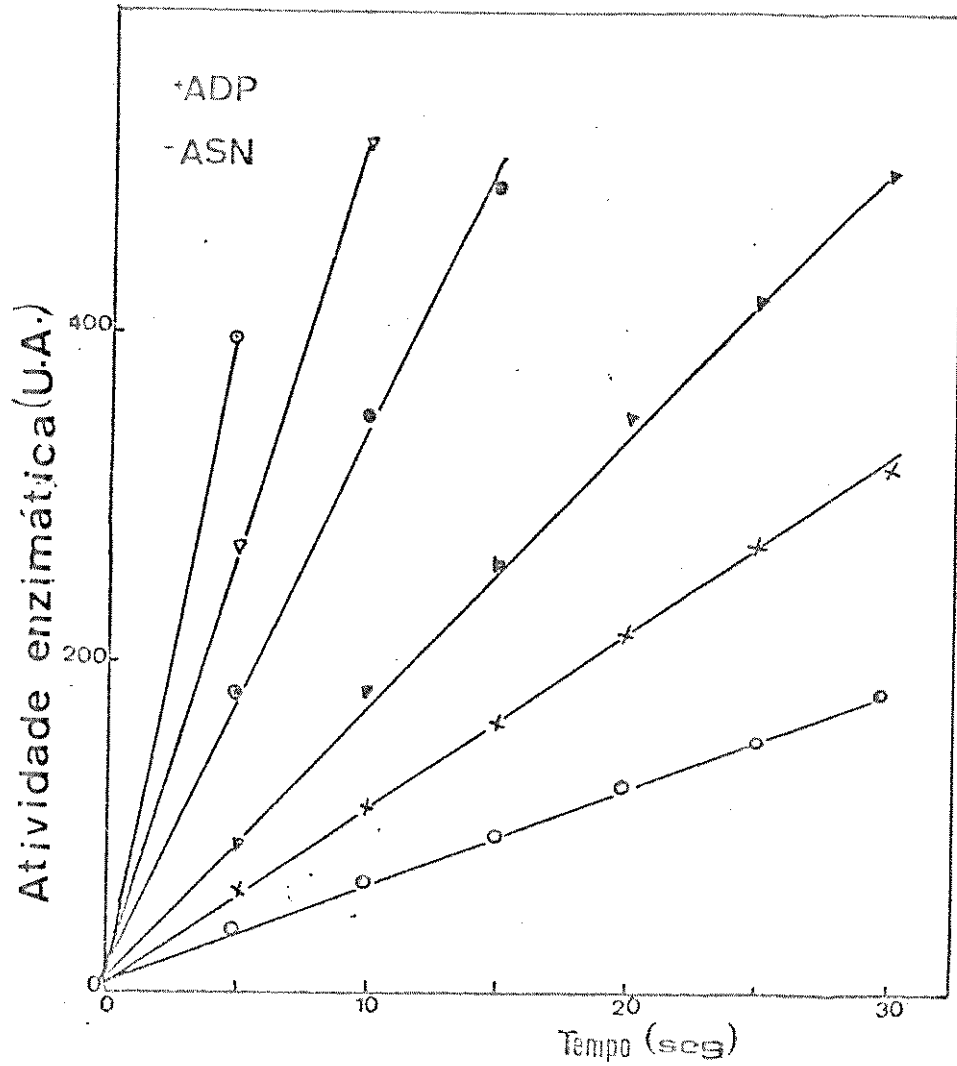


FIGURA 13 - Variação da atividade da reação enzimática em função do tempo de reação, da concentração de GlDH de coração de Bufo paracnemis, na presença de ADP 0,1 mM e Asn 50 mM. (○—○) com 64 µg de proteínas totais do EB; (x—x) com 128 µg de proteínas totais do EB; (▲—▲) com 256 µg de proteínas totais do EB; (●—●) com 512 µg de proteínas totais do EB; (△---△) com 1024 µg de proteínas totais do EB e (○—○) com 2048 µg de proteínas totais do EB. Detalhes sobre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

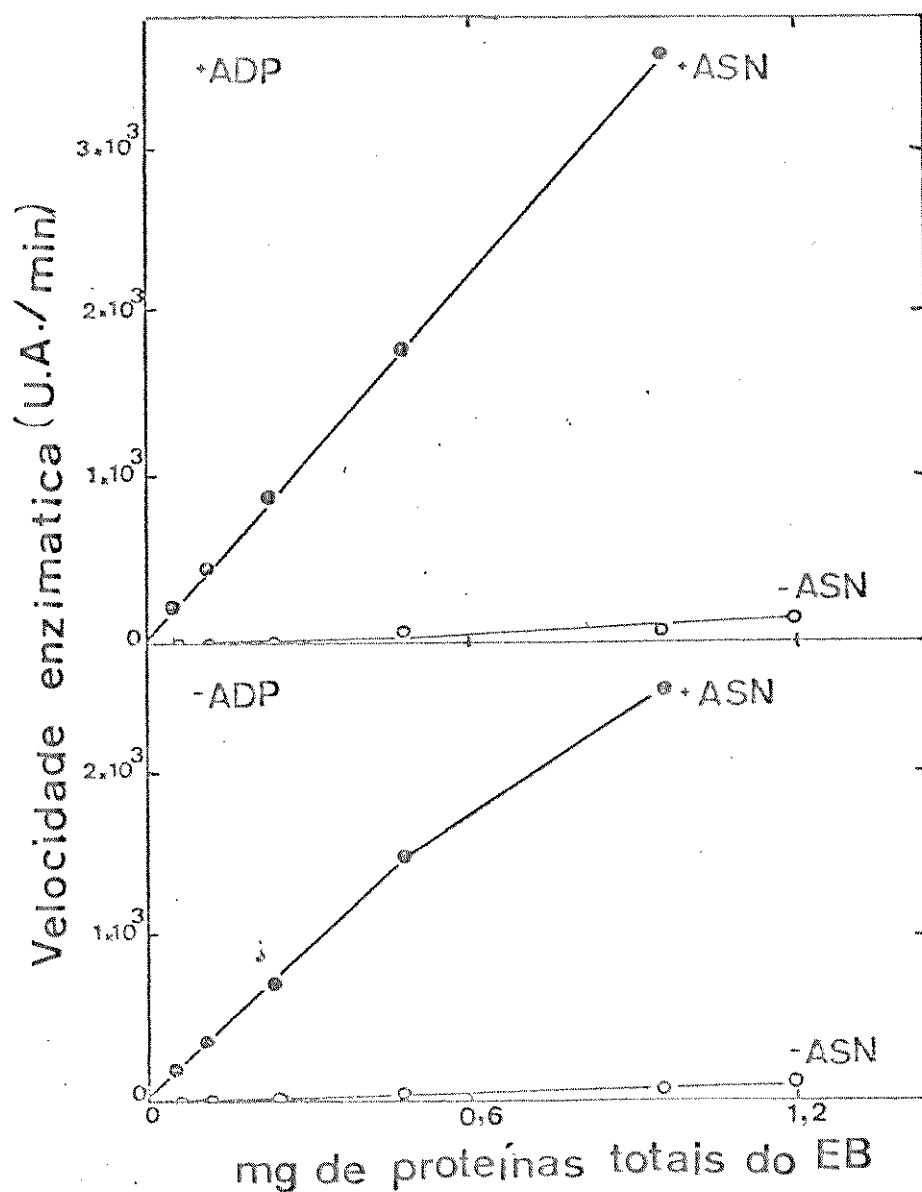


FIGURA 14 - Efeito da concentração da GlDH de coração de Bufo paracnemis, sobre a atividade enzimática, na ausência e presença de Asn 50 mM e ADP 0,1 mM. Detalhes sobre as condições experimentais ver em Materiais e Métodos.

TABELA 2 - Efeito do ADP 0,1 mM sôbre a atividade da GlDH de coração de B. paracnemis, na ausência e presença de Asn 50 mM.

Conc. da GlDH ⁽¹⁾ ug/ml	Velocidade da reação enzimática [U.A./min]			
	-ADP-Asn	+ADP-Asn	-ADP+Asn	+ADP+Asn
64	4	4	150	180
120	10	8	360	420
256	12	10	720	900
512	24	24	1500	1800
1024	72	80	2500	3600
2048	120	140	-	-

(1) Quantidade de ug de proteína do EB no volume final de incubação.

Comparando-se os valores da atividade enzimática da G1DH de coração de B. paracnemis na ausência e na presença de ADP 0,1 mM e Asn 50 mM em diferentes concentrações da enzima, observamos que, quando a Asn não está presente na reação o ADP não estimula a reação enzimática, nas concentrações da enzima estudada, no entanto na presença de Asn o ADP estimula cerca de 20% o efeito da Asn (Tabela 3).

3.6. Atividade da G2DH de diferentes órgãos de anfíbios na ausência e presença de Asn 50 mM :

Quando se determinava a atividade da GDH, usando-se NAD^+ e glutamato com substrato na presença de Asn 50 mM, não pudemos observar nenhum efeito significativo desse aminoácido sobre a G2DH de rim e coração de girino de Rana catesbeiana e fígado e coração de Bufo paracnemis (Tabela 4), o mesmo acontecia com as G2DH de outras origens (resultados não apresentados nesse trabalho), em comparação com o efeito causado pela Asn sobre a atividade enzimática da G1DH.

TABELA 3 - Relação entre as atividades enzimáticas da G1DH de coração de B. paracnemis, na ausência e presença de ADP 0,1 mM e Asn 50 mM, em diferentes concentrações da enzima.

Relação entre as atividades	Concentração da G1DH (ug/3ml)				
	64	128	256	512	1024
+ADP-Asn/-ADP-Asn	1,0	0,8	0,8	1,0	1,1
-ADP+Asn/-ADP-Asn	37,5	36,0	60,0	62,5	34,7
+ADP+Asn/-ADP-Asn	45,0	42,0	75,0	75,9	50,0
+ADP+Asn/+ADP-Asn	45,0	52,5	90,0	75,0	45,0
+ADP+Asn/-ADP+Asn	1,2	1,2	1,2	1,2	1,4

Obs: Os valores da atividade enzimática, utilizados para a elaboração dessa tabela foram obtidos a partir dos resultados expostos na Tabela 2.

TABELA 4 - Atividade da G2DH de diferentes órgãos de anfíbio, na ausência e presença de Asn 50 mM.

Origem da G2DH	Atividade específica (U.A./min/mg)	
	sem asparagina	com asparagina
Rim de gR_c (1)	3,45	3,26
Coração de gR_c	22,50	18,79
Fígado de B_p (2)	1,47	1,33
Coração de B_p	15,62	11,71

(1) gR_c = girino de R. catesbeiana

(2) B_p = B. paracnemis.

Obs: As velocidades das reações catalisadas pela G2DH foram determinadas em pH 8,7; outros detalhes ver em Materiais e Métodos.

3.7. Efeito da Gln 50 mM, sôbre a atividade da G1DH de coração de B. paracnemis na ausência e presença de Asn 50 mM :

A Gln 50 mM não altera a atividade enzimática da G1DH de coração de B. paracnemis, mas inibe cerca de 20% o efeito da Asn sôbre essa enzima, demonstrado para diferentes concentrações de G1DH (Tabela 5).

TABELA 5 - Efeito da Gln 50 mM, sôbre a atividade de G1DH de coração de B. paracnemis na ausência e presença de Asn 50 mM.

Conc. G1DH (ug/3ml) ⁽¹⁾	Velocidade enzimática (U.A./min) ⁽²⁾			
	-Asn-Gln	-Asn+Gln	-Asn-Gln	+Asn+Gln
64	4	0	150	90
128	10	0	360	320
256	12	15	720	600
512	24	28	1500	1200
1024	72	80	2500	2000
2048	120	120	-	2500

(1) Quantidade de ug de proteína do EB no volume final da reação.

(2) Outros detalhes ver em Materiais e Métodos.

IV. DISCUSSÃO.

Os resultados apresentados nesta Tese, demonstram que a Asn tem a capacidade de aumentar significativamente a velocidade da reação enzimática catalisada pela G1DH, enquanto que esse efeito não foi por nos demonstrado sobre a atividade enzimática catalisada pela G2DH.

A velocidade enzimática da G1DH é alterada por concentração de Asn desde 1 até 50 mM, onde o efeito atinge seu maior valor, visto que, quando usávamos concentrações superiores àquela o aumento da atividade foi praticamente o mesmo (Figura 1).

Investigando-se o efeito da Asn 50 mM sobre a G1DH de diferentes órgãos de anfíbios e de rato, observamos que a Asn tinha um efeito bem maior sobre a G1DH de coração em relação a de fígado ou de rim do mesmo animal, tanto para os anfíbios como para rato, o que sugere que provavelmente estejamos em presença de isoenzimas.

A G1DH de coração de boi apresenta um pH ótimo, entre 8,1 a 8,5 quando a coenzima utilizada é o NADH (OLSON e ANFINSEN, 1953). Nossos resultados mostram que o pH ótimo da G1DH de fígado, rim e coração de anfíbios e coração e rim de rato é também em torno de 8,0 a 8,5 , excepcionalmente encontrados para G1DH de fígado de rato um pH ótimo em torno de 7,5. Por outro lado, quando ensaiávamos as mesmas G1DH na presença de Asn 50 mM observávamos um deslocamento do pH para o lado mais alcalino, entre 8,5

a 9,1 (Figuras 2 a 4). Esse fato pode indicar uma possível alteração na constante de dissociação de algum grupo ionizável da enzima importante para o mecanismo da mesma.

Estudamos o efeito da variação da concentração de enzima nas reações catalisadas pela G1DH das várias origens descritas nesse trabalho, na ausência de Asn, observamos que esse efeito é uma função exponencial, isto é, quanto maior a concentração da enzima a atividade da G1DH variava exponencialmente, esses dados estão em acordo com os descritos por EISENBERG (1973), THUSIUS et al (1975) e THUSIUS (1975). Esses autores relatam que quanto maior a concentração da enzima maior o estado de agregação com o consequente aumento da atividade enzimática. No entanto, demonstramos que aquele efeito era linear, ou seja, a variação da atividade enzimática é diretamente proporcional a variação da concentração da enzima.

Da mesma forma observamos que a dependência da atividade enzimática em função do tempo de reação é linear na presença de Asn e na ausência de Asn o período de tempo no qual a referida dependência é linear é relativamente muito curto.

Nas nossas condições experimentais, em que trabalhamos com baixas concentrações de enzima, não pudemos demonstrar um efeito ativador do ADP, que é um efetor alostérico (BITENSKY et al., 1965 ; DESSEN e PANTALONI, 1973 ; JALLON et al., 1975), sobre a atividade da G1DH. A presença do ADP 0,1 mM nas reações catalisadas pela G1DH de coração de B. paracnemis, estimula cerca de 20% o efeito causado pela Asn sobre a enzima (Tabela 2 e 3).

A glutamina que metabolicamente está mais relacionada com o glutamato e o alfa-cetoglutarato do que a asparagina, parece não mostrar nenhum efeito significativo sobre a GlDH de coração de B. paracnemis, por outro lado nossos dados sugerem que a Gln parece favorecer uma inibição de cerca de 20% no efeito da asparagina sobre a atividade da GlDH.

V. RESUMO,

A L-glutamato desidrogenase (GDH) [L-glutamato NAD(P) oxi-redutase (desaminante) E.C.1.4.1.2-4] enzima chave da regulação do metabolismo da amônia, do glutamato e do alfa-cetoglutarato, foi preparada a partir de um extrato bruto de brometo de cetiltrimetilamônia 0,1% de fígado, rim e coração de Bufo paracnemis, Rana catesbeiana e de rato. Essa enzima catalisa reversivelmente a desaminação oxidativa do glutamato dependente de NAD(P).

A asparagina (Asn) nas concentrações desde 1 a 50 mM mostrou ser capaz de causar um extraordinário efeito sobre a atividade da GDH, isto é, quando a reação se processa em presença de NADH, causando um aumento de 10 a 94 vezes na velocidade da catálise enzimática, dependendo da origem da glutamato desidrogenase e das condições experimentais, porém nenhum efeito foi observado sobre a GDH, isto é, quando a reação se dava em presença do NAD⁺.

O efeito da asparagina não é idêntico para enzimas de origens diferentes e mesmo quanto a órgãos diferentes do mesmo animal. A GDH proveniente de coração de B. paracnemis e R. catesbeiana e de coração de rato mostrou ser bem mais sensível à asparagina do que a enzima de outros órgãos do mesmo animal.

A Asn causa um deslocamento do pH ótimo da reação enzimática, aumentando-o de cerca de meia unidade de pH. Esse fato pode sugerir que a Asn possa alterar a cons-

tante de dissociação de algum grupo ionizável da enzima importante para a reação enzimática.

A atividade da G1DH de fígado, rim e coração de B. paracnemis, R. catesbeiana e de rato, apresenta a característica de variar exponencialmente em função da variação da concentração da enzima, essa característica está relacionada com o aumento do estado de agregação causado pelo aumento da concentração da enzima. Entretanto, na presença de Asn 50 mM, para todas as G1DH estudadas, aquela função é linear, ou seja, a atividade enzimática é diretamente proporcional à variação da concentração da enzima.

A ADP 0,1 mM, não estimula a G1DH nas nossas condições de baixas concentrações de enzima e aumenta cerca de 20% o efeito da Asn sobre a G1DH de coração de B. paracnemis. A Gln 50 mM não causa nenhum efeito sobre a G1DH de coração de B. paracnemis, semelhante ao da Asn 50 mM, todavia inibe cerca de 20% o efeito da Asn 50 mM sobre a enzima.

VI, ABSTRACT.

The L-glutamate dehydrogenase (GDH) [L-glutamateNAD(P) oxidoreductase (deaminating) E.C.1.4.1.2-4], a key regulatory enzyme of NH_3 , glutamate and alfa-ketoglutarate metabolism, was extracted with 0,1% cetyltrimethyl ammonium bromide from liver, kidney and heart of the amphibians Bufo paracnemis and Rana catesbeiana and rat. This enzyme catalyses the reversible reaction of oxidative deaminating of the glutamate NAD(P) dependent.

Asparagine (Asn) at concentration from 1 to 50 mM cause a dramatic increase on G1DH activities, i.e., when the enzyme catalyses the reaction on the presence of NADH and alfa-ketoglutarate, from 10 to over 90 times, depending on the enzyme origin. However, no effect was observed on G2DH, i.e., when the enzyme catalyzes the reaction on the presence of NAD^+ and glutamate. The effect of Asn is different with respect on animal organs. The B. paracnemis, R. catesbeiana and rat heart G1DH is much more affected by Asn 50 mM then G1DH from kidney and liver of same animal.

The optimum pH of G1DH reaction is increased about 0.5 pH unit by the presence of Asn 50 mM. This fact may suggest that the Asn could change the dissociation constant of some ion group of the enzyme with importance to enzymatic reaction.

The B. paracnemis, R. catesbeiana and rat liver, kidney and heart G1DH has the characteristic of chan-

ging the enzymatic activity exponentially by the changing of the enzyme concentration. This characteristic is related with the state of protein aggregation that is caused by the increase of enzyme concentration. On the other hand, G1DH has a linear dependence of the enzyme activity in function of enzyme concentration when Asn 50 mM is present during the enzymatic reaction.

ADP 0.1 mM does not increase the B. paracnemis heart G1DH, at our experiment conditions of low enzyme concentrations, but increases about 20% the effect of Asn on that enzyme. Glutamine 50 mM does shown any effect on B. paracnemis heart G1DH, but decreases about 20% the effect of Asn on that enzyme.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS,

- ANDREE, P.J. and ZANTEMA, A. Electron spin resonance and nuclear relaxation studies on spin-labeled glutamate dehydrogenase. Biochem., 17(5):778-783, 1978.
- ARST, H.N.Jr. and MACDONALD, D.W. A mutant of Aspergillus nidulans lacking NADP-linked glutamate dehydrogenase. Molec.Gen.Genet., 122:261-265, 1973.
- _____ ; PARBTANI, A.A.M. and COVE, D.J. A mutant of Aspergillus nidulans defective in NAD-linked glutamate dehydrogenase. Molec.Gen.Genet., 138:165-171, 1975.
- BEZERRA, T.C. e TAHIN, Q.S. Efeito da asparagina sobre a atividade da GDH hepática de anfíbios. In: Resumos da VI^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 49, 1977.
- BITENSKY, M.W.; YIELDING, K.L. and TOMKINS, G.M. The effect of allosteric modifiers on the rate of denaturation of glutamate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 240(3):1077 - 1082, 1965.

- BROWN, C.M.; BOCCU, E. and BEVILACQUA, R. Presence of glutamate synthase in fission yeasts and its possible role in ammonia assimilation. Nature New Biology, 246: 115-116, 1973.
- CAMARDELLA, L.; di PRISCO, G.; GAROFANO, F. and GUERRINI, A.M. Purification and properties of NAD-dependent glutamate dehydrogenase from yeast nuclear fractions. Biochim, Biophys. Acta., 429: 324-330, 1976.
- CASOLA, L.; RUFFILI, A. and di PRISCO, G. Nuclear glutamate dehydrogenase: Unique antigenic determinants common to the mitochondrial enzyme. J. Mol. Biol., 87: 859-861, 1974.
- CAZZULO, J.J.; JUAN, S.M. and SEGURA, E.L. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in Trypanosoma cruzi. Comp. Biochem. Physiol., 56B: 301-303, 1977.
- COHEN, R.J. and BENEDEK, G.B. The functional relationship between polymerization and catalytic activity of beef liver glutamate .I. Theory. J. Mol. Biol., 108: 151-178, 1976.
- DESSEN, P. et PANTALONI, D. Glutamate déshydrogénase. Modulation de la distribution des polyhexamères par les coenzymes et effecteurs spécifiques. Eur. J. Biochem., 39: 157-169, 1973.

- di MATTEO,G.; di PRISCO,G. and ROMEO,G. Mitochondrial and nuclear GDH in chinese hamster ovary cells in culture. BiochimBiophys.Acta.,429:694-704,1976.
- EISENBERG,H.; JOSEPHS,R. and REISLER,E. Bovine liver glutamate dehydrogenase. In: ANFINSEN,C.B.; EDSALL,J. T. and RICHARDS,F.M. Advances in Protein Chemistry. New York,Academic Press Inc.,1976,30:101-177.
- EPSTEIN,I. and GROSSOWICZ,N. Purification and properties of glutamate dehydrogenase from a thermophilic bacillus. J.Bacteriol.,122(3):1257-1264,1975.
- FISHER,H.F. Glutamate dehydrogenase-ligand complexes and their relationship to the mechanism of the reaction. In:MEISTER;a. Advances in Enzymology.New York, John Wiley and Sons,1973,39:369-418.
- FRIEDEN,C. L-glutamate dehydrogenase. In: BOYER,P.D.; LARDY,H. and MYRBÄCK,K. The Enzymes.New York,Academic Press,1963,7:3-24.
- _____ and COLMAN,R.F. Glutamate dehydrogenase concentration as a determinant in the effect of purine nucleotides on enzymatic activity. J.Biol.Chem.,242 (8):1705-1715,1967.

- GRENSON, M.; DUBOIS, E.; PIOTROWSKA, M.; DRILLIEN, R. and AIGLE, M. Ammonia assimilation in Saccharomyces cerevisiae was mediated by two glutamate dehydrogenase. Molec. Gen. Genet., 128:73-85, 1974.
- HUANG, C.Y. and FRIEDEN, C. The mechanism of ligand-induced structural changes in glutamate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 247(1):3638-3646, 1972
- JALLON, J.M.; RISLER, Y. and IWATSUBO, M. Beef-liver L-glutamate dehydrogenase mechanism: Presteady state study of the catalytic reduction of 2-oxoglutarate by NADPH. Biochem. Biophys. Research Commun., 67(4):1527-1536, 1975.
- _____ ; di FRANCO, A. et IWATSUBO, M. Étude cinétique de changements conformationnels de la L-glutamate déshydrogénase provoqués par le couple effecteur GTP+NADH. Eur. J. Biochem., 13:428-437, 1970.
- JANSSENS, P.A. The influence of ammonia on the transition to ureotelism in Xenopus laevis. J. Exp. Zool., 182(3):357-366, 1972.
- JULLIEN, M. and THUSIUS, D. Mechanism of bovine liver glutamate dehydrogenase of self-assembly. III. Characterization of the association-dissociation stoichiometry with quasi-elastic scattering. J. Mol. Biol., 101:397-416, 1976.

- KAPOOR, M. and PARFETT, C.L. Ligand-induced alterations in the reactivity of sulfhydryl groups and the structure of bovine liver glutamate dehydrogenase. Archivies. Biochem. Biophys., 184:518-528, 1977.
- KAWAJIRI, K.; HARANO, T. and OMURA, T. Biogenesis of the mitochondrial matrix enzyme, glutamate dehydrogenase, in rat liver cells..I. Subcellular localization, biosynthesis and intracellular translocation of glutamate dehydrogenase. J. Biochem., 82:1403-1416, 1977.
- KINGHORN, J.R. and PATEMAN, J.A. The regulation of NAD L-glutamate dehydrogenase in Aspergillus nidulans. Genet. Res. Camb., 23: 119-124, 1974.
- KLYUEVA, N.N. and TITOVA, G.V. Influence of thiol reagents on the interaction of glutamate dehydrogenase with sex hormones. Biokhimiya., 41(5):903-905, 1976.
- KOBERSTEIN, R. and SUND, H. Studies on glutamate dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 36:545-552, 1973.
- KRAUSE, J.; BÜHNER, M. and SUND, H. Studies on glutamate dehydrogenase. The binding of NADH and NADPH to beef-liver glutamate dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 41:593-602, 1974.
- LAN, N.C.Y.; FRIEDEN, E.H. and RAWITCH, A.B. Purification and properties of bovine uterine glutamic dehydrogenase: A com

parasion with the liver enzyme. Int.J.Biochem.,6:871-875,1975.

LOWRY,O.H.; ROSEBROUG,N.J.;FARR,A.L. and RANDALL,R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol. Chem.,193:265-275,1951.

MAGNA,L.A.; MEIRELLES,N.C. e TAHIN,Q.S. Estudos comparativos da regulação do metabolismo de compostos nitrogenados de anfíbios anuros aquáticos (Pipa carvalhoi) e terrestres (Hyla geographica). In:Resumos da 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 226,1975.

_____ ; BEZERRA,T.C.;TAHIN,C. e TAHIN,Q.S. Regulação do metabolismo da NH_3 de anfíbios aquáticos e terrestres durante o desenvolvimento. In:Resumos da Vª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica,107,1976.

MALENCIK,D.A. and ANDERSON,S.R. Reduced pyridine nucleotide binding to beef liver and dogfish liver glutamate dehydrogenase. Biochem.,11(5):2766-2771,1972.

MEIRELLES,N.C. e TAHIN,Q.S. Efeito de moduladores de associação cooperativa entre protômeros da GDH L-glutamato NAD^+ oxi-redutase(desaminante)E.C.1.4.1.3. de fígado de anuros brasileiros. In: Resumos da 27ª Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência,412,1975.

- OLSON, J.A. and ANFINSEN, C.B. The crystallization and characterization of L-glutamic acid dehydrogenase. J. Biol. Chem., 197:67-79, 1952.
- _____. Kinetic and equilibrium studies on crystalline L-glutamic acid dehydrogenase. J. Biol. Chem., 202:841-856, 1953.
- PANTALONI, D. et LÉCUYER, B. Glutamate déshydrogénase. Eur. J. Biochem., 40:381-401, 1973.
- RASCHED, I.; JÖRNVALL, H. and SUND, H. Studies of glutamate dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 41:603-606, 1974.
- ROBERTS, D.B. An immunological study of Neurospora an mutant using antibodies prepared against glutamate dehydrogenase subunits. J. Gen. Microbiol., 69:143-144, 1971.
- SANWAL, B.D. and LATA, M. Concurrent regulation of glutamic acid dehydrogenase of Neurospora. Archives. Biochem. Biophys., 97:582-588, 1962.
- SEYAMA, S., SAEKI, T. and KATUNUMA, N. Comparasion of properties and inducibility of glutamate dehydrogenase in rat liver kidney and liver. J. Biochem., 73:39-45, 1973.
- SHAFER, J.A.; CHIANCONE, E.; YIELDING, K.L. and ANTONINI, E. In intermediates in the reaction catalyzed by glutamate dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 28(4):528-532, 1972.

TAHIN, Q.S., PIMENTEL, E.R.; BEZERRA, T.C.; CARBOGGINI, S.B. and GÓMEZ-PUYOU, A. NH_3 metabolism of terrestrial and aquatic amphibians. IRCS Medical Science, 6:241, 1978.

TALAL, N. and TOMKINS, G.M. Antigenic differences associated with conformational changes in glutamate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta., 89:226-231, 1964.

THUSIUS, D.; DESSEN, P. and JALLON, J.M. Mechanism of bovine liver glutamate dehydrogenase self-association. J. Mol. Biol., 92:412-432, 1975.

_____. Mechanism of bovine liver glutamate dehydrogenase self-assembly. J. Mol. Biol., 94:367-383, 1975.

_____. Does a functional relationship exist between the polymerization and catalytic activity of beef liver glutamate dehydrogenase? J. Mol. Biol., 115:243-247, 1977.

TOMKINS, G.M.; YIELDING, K.L.; CURRAN, J.F.; SUMMERS, M.R. and BITENSKY, M.W. The dependence of the substrate specificity on the conformation of crystalline glutamate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 240(10):3793-3798, 1965.

YIELDING, K.L. and TOMKINS, G.M. Structural alterations in crystalline glutamic dehydrogenase induced by steroid hormones. Proc. Nat. Acad. Sci., 46:1483-1488, 1960.

VERONESE, F.M.; BOCCU, E. and COVENTI, L. Glutamate dehydrogenase from Escherichia coli: Identification, purification and properties of the enzyme. Biochim. Biophys. Acta., 377: 217-228, 1975.

_____ ; BEVILACQUA, R.; BOCCU, E. and BROWN, D.M. Glutamate dehydrogenase from tuna liver. Biochem. Biophys. Acta., 445: 1-13, 1976.

WALTON, M. and COWEY, C.B. Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout, Salmo gairdneri. Comp. Biochem. Physiol., 57B: 143-149, 1977.

As referências Bibliográficas foram citadas de acordo com o Estudo de Documentação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (A.B.N.T.), Rio de Janeiro, 1969.